

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 今西 悠華
論文題目 歯髄幹細胞由来 extracellular vesicles の 骨組織再生における有効性について	

I. 緒 言

疾病や外傷等によって不可逆的な損傷を受けた組織・臓器の機能を回復するためには、従来より臓器移植医療や人工臓器の開発が行われてきた。臓器移植は有効な治療法であるが、深刻なドナー臓器の不足、免疫拒絶を始め、多くの医学的、社会的、倫理的問題を抱えている¹⁾。また、人工臓器についても、生体臓器の機能を完全に置換することは容易でなく、多様な疾患に対応できる状況ではない²⁾。このような問題点を補う方法として、患者やドナーから採取した少量の組織・細胞を基に、体外で作製した正常な細胞・組織を損傷部位に移植することで機能回復を図る再生医療が注目され、研究・臨床応用が進んでいる³⁾。

再生医療への応用が期待される細胞には、胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞)、体性幹細胞等がある。ES 細胞および iPS 細胞は、自己と同様の未分化な細胞を作り出す自己複製能および理論上どのような細胞にも分化できる多分化能を有する。しかし、ES 細胞は受精卵より樹立されるため倫理上の問題があり、iPS 細胞は腫瘍化および作製時の遺伝子導入による安全上の問題が懸念される⁴⁾。一方、体性幹細胞は生体内に存在することから倫理的配慮の必要が少なく、限られた固有の細胞への分化能を持つ⁵⁾。

特に体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : MSCs) は、免疫調節作用、障害された組織への集積性、組織再生に有効な液性因子であるサイトカイン、増殖因子、細胞外小胞 (Extracellular vesicles : EVs) 等の産生能が認められ、心筋梗塞、全身性エリテマトーデス、クローン病、移植片対宿主病、外傷性脊髄損傷等、様々な疾患を対象に臨床研究が進められている^{6,7)}。

MSCs の作用は、移植した MSCs が障害された組織に到達し、生着および分化することで機能回復に寄与する。さらに、MSCs が直接あるいは MSCs により刺激された他の細胞が、栄養因子、サイトカイン、EVs 等を産生することによっても機能回復をもたらす⁸⁾。近年、移植した MSCs の生着率が低いとの報告⁹⁾や、MSCs 移植後早期に機能改善が認められたとの報告¹⁰⁾がなされていることから、MSCs の移植効果は MSCs の液性因子のパラクライン効果によるところが大きいと考えられており、MSCs に由来する EVs (mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles : MSC-EVs) が免疫調節作用や組織再生作用に重要な役割を担っていることが明らかとなっている^{11,12)}。MSC-EVs は、MSCs と同様に炎症部位に集積する能力を有することが示唆されている¹³⁾。MSC-EVs は多様な疾患に効果を示すが、内部にタンパク質や核酸、脂質といった様々な分子を内包しており、分泌する細胞によって内包物は異なるため、異なる組織に由来する MSC-EVs の性質には相違が生じることが、研究の進展とともに明らかとなっている^{14,15)}。

歯科領域においては、MSCs 移植による骨再生、歯周組織再生、歯髄再生等に関する臨床研究^{16,17)}が行われ、補綴歯科領域に関わる研究としては顎骨欠損部の再生を目指した研究 (UMIN000027268、UMIN000033847) が報告されている¹⁸⁾。

MSCs は、骨、軟骨、脂肪、筋肉等の組織に分化し、骨髄、脂肪、臍帯組織、歯髄ならびに歯周組織等の広範な組織から採取が可能である。中でも、歯髄から分離される MSCs は、歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells : DPSCs) として知られ、歯髄細胞が硬組織に保護されているため外的損傷を受けにくい環境にあること、歯科治療時に従来は廃棄されていた第三大臼歯等の抜去歯から採取可能であること、若年時に採取可能であるため細胞老化や全身疾患の影響を受けにく

い等の利点により、再生医療の細胞源として期待されている^{19,20)}。

近年、歯髄幹細胞由来細胞外小胞 (dental pulp stem cells-derived extracellular vesicles : DPSC-EVs) は、放射線療法による造血障害²¹⁾や骨欠損²²⁾などの疾患に有効性を示すと報告されている。しかし、DPSC-EVs を用いた研究は、骨髄や脂肪組織に由来する MSC-EVs の研究²³⁾と比較して、報告が少なくその特性等について未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、DPSC-EVs が骨創傷治癒において DPSCs の持つ骨組織再生促進効果の一端を担うと考え、DPSC-EVs の有効性を明らかにするために DPSC-EVs を用いた *in vivo* 実験系を構築し、骨組織形成能について検討した。

II. 実験材料および方法

1. DPSCs の分離および培養

6 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (中部科学資材株式会社, 愛知) に、イソフルラン (ゾエティス・ジャパン, 東京) を吸引により安楽死させ、下顎中切歯を抜去した。抜去歯より採取した歯髄組織に、0.1% コラゲナーゼおよび 0.25% トリプシンを用いて酵素処理を行った後、プラスチックディッシュ上に播種し、Minimum essential medium eagle-alpha modification (α -MEM; Gibco Laboratories Inc., Grand Island, NY, USA) に 20% ES 細胞用ウシ胎児血清 (Embryonic Stem Cell Fatal Bovine Serum : ES-FBS; Gibco) および 1% penicillin streptomycin (Gibco) を添加した培地を用いて、DPSCs の分離、培養を行った。細胞形態を位相差顕微鏡 (CKX53; オリンパス株式会社, 東京) により観察した。実験には、加湿した 37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて培養した第 3-6 継代の DPSCs を使用した。本実験は、愛知学院大学動物実験実施規程に従い、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認を受けて実施している。(承認番号 AGUD437-2)

2. DPSCs の同定

1) 表面抗原解析

歯髄組織より分離・培養した DPSCs を用いて同定を行った。抗体は FITC 共役ハムスター抗ラット CD29 モノクローナル抗体 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)、PE 共役マウス抗ラット CD34、CD45 モノクローナル抗体 (Becton Dickinson)、FITC 共役マウス抗ラット CD49d および CD90 モノクローナル抗体 (Becton Dickinson) を用いた。コントロールとして FITC 共役マウス IgG モノクローナル抗体、FITC 共役ハムスター IgM モノクローナル抗体、PE 共役マウス IgG モノクローナル抗体 (Becton Dickinson) を使用した。MACSQuant Flow Cytometer (MACSQuantifyTM, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてフローサイトメトリーを行い、MACSQuantifyTM Software (MACSQuantifyTM, Miltenyi Biotec GmbH) を用いて解析した。

2) 多分化能評価

DPSCs を 4 チャンバースライドに 1×10^4 個播種し、脂肪、骨分化誘導を行った。脂肪分化誘導においては、h-insulin (recombinant)、L-glutamine、mesenchymal cell growth supplement (MCGS)、dexamethasone、indomethacin、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、GA-1000 を含

む、脂肪分化誘導メディアウム (hMSCs Differentiation Media BulletKits-Adipogenic; Lonza, Basel, Switzerland) を用いて培養を行った。その後、h-insulin (recombinant)、L-glutamine、MCGS、GA-1000 を含むメンテナンスメディアウムを用いて培養した。3週間後、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定を行い、oil red O 染色 (Polysciences, Warrington, PA, USA)、fatty acid-binding protein-4 (FABP-4) 免疫染色 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を行った。

骨分化誘導においては、dexamethasone、L-glutamine、ascorbate、penicillin streptomycin、MCGS、 β -glycerophosphate を含む骨分化誘導メディアウム (hMSCs Differentiation Media BulletKits-Osteogenic; Lonza) を用いて培養を行った。3週間後、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定を行い、alkaline phosphatase (ALP) 染色 (Millipore, Billerica, MA, USA)、osteocalcin 免疫染色 (R&D Systems) を行った。

3. DPSC-EVs の抽出

DPSCs を 6well プレートに 1×10^5 個播種し、20%FBS および 1%penicillin streptomycin を添加した α -MEM で 24 時間培養した。 α -MEM を無血清培地に交換し、48 時間培養した²⁴⁾。無血清培地を回収し、 $2,000 \times g$ で遠心分離を行い、沈殿物を除去した培養上清を採取した。無血清培地から得られた培養上清に対して 0.5 倍量の Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加し、 4°C にて 12 時間静置した。その後、 $10,000 \times g$ にて 2°C で 1 時間遠心分離し、DPSC-EVs を抽出した。DPSC-EVs をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate -buffered saline : PBS) (Sigma-Aldrich Co.LLC, St.Louis, MO, USA) に再懸濁し、 -30°C にて保存した。

4. DPSC-EVs の同定

1) 透過型電子顕微鏡による形態観察

親水化处理したエクセルサポートフィルム (日新 EM, 東京) に DPSC-EVs を $2 \mu\text{l}$ 滴下し、室温にて 2 分間インキュベートした。エクセルサポートフィルムを $10 \mu\text{l}$ の酢酸ウラニルで 10 秒間処理し、乾燥後にカーボン蒸着 (IB-3 ION Coater; Eiko Engineering, 茨木) を行った。透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope : TEM) (JEM-1400 Plus system; JEOL Ltd, 東京) を用いて、エクセルサポートフィルム上の DPSC-EVs の形態を観察した。

2) DPSC-EVs に含有されるタンパク質の検出

DPSC-EVs に含まれるタンパク質を検出するため、CD9 (Abcam, Cambridge, UK) および α -tubulin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を使用した。HRP 標識抗ウサギモノクローナル IgG 抗体 (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) をメンブレンに添加し反応させた。メンブレンは ECLplus 化学発光検出キット (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Chemidoc Touch (Bio-rad, Hercules, CA, USA) により画像化した。

5. ラット頭頂骨欠損部への DPSC-EVs 投与および DPSCs 移植の方法

1) 実験動物および頭頂骨部の手術方法

実験動物として、11 週齢雄性 SD ラットを用いた。ラットにイソフルランを吸引させて麻酔を

施し、歯科用トレフィンバー（株式会社インプラテックス，東京）を使用し、頭頂骨の両側に直径 4.6mm の骨欠損部を形成した。移植側を右側、対照側を左側とした。

2) 頭頂骨欠損部への DPSC-EVs 投与および DPSCs 移植の方法

移植側である頭頂骨欠損部に足場材料として collagen (CollaTape®; Integra Life Sciences, Princeton, NJ, USA)、 β -tricalcium phosphate (β -TCP) (CERASORB®M (0.5-1mm); Curasan AG, Kleinostheim, Germany)、hydroxyapatite (HA) (NEOBONE® (0.5-1mm); CoorsTek KK, 東京) を移植後、DPSC-EVs ($0.0615 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) を投与または DPSCs (1×10^6 個/ml) を移植した。対照側である頭頂骨欠損部は、生理食塩水の投与もしくは collagen、 β -TCP または HA の移植を行った。

6. マイクロ CT による形態計測および定量分析

ラット頭頂骨欠損部の移植側に DPSC-EVs/足場材料 (collagen、 β -TCP、HA)、および DPSCs/足場材料 (collagen、 β -TCP、HA) を移植し、対照側に生理食塩水を投与または足場材料を単体で移植した。術後 4 週に、イソフルランによる吸入麻酔下で、マイクロ CT (COSMO Scan GX; Rigaku, 東京) を使用し、ラット頭頂骨欠損部の断層撮影を行った²⁵⁾。撮影条件は管電圧 90kV、管電流 $88 \mu\text{A}$ 、画像サイズ 512×512 ピクセル、撮影時間 2 分とした。水平断面と矢状断面を含む三次元画像を再構築し、TRI/3DBONE ソフトウェア (RATOC システムエンジニアリング, 東京) を使用して不透過像領域の体積を算出した。

7. ラット頭頂骨欠損部の組織観察

ラット頭頂骨欠損部の移植側に DPSC-EVs/足場材料 (collagen、 β -TCP、HA) を移植し、対照側に生理食塩水を投与または足場材料を単体で移植した。術後 16 週に、ラット頭頂骨を採取し、10%ホルマリン溶液 (Muto Pure Chemicals Co., Ltd, 東京) に固定した。固定後、頭頂骨を 20%Plank-Rychlo 溶液 (Muto Pure Chemicals Co., Ltd) を使用して室温で 4 日間脱灰し、5%硫酸ナトリウム溶液で中和した後、流水で 24 時間洗浄した。頭頂骨は脱灰後、不要な部分を切除し、液体窒素で冷却したイソペンタン中にて、凍結包埋材 (super cryoembedding medium: SCEM) を用いて包埋した。作製した凍結 SCEM ブロックを試料ホルダーに凍着し、マイクローム (CM3050S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) に装着した。SCEM ブロックの表面に接着フィルム (クライオフィルム; FINETEC, 札幌) を貼り付け、タングステンプレート (TC-65; Leica Microsystems) で厚さ $5 \mu\text{m}$ の切片を作製した。これらは川本の方法²⁶⁾を参考に行った。

切片は hematoxylin-eosin (HE) を用いて染色し、光学顕微鏡 (株式会社ニコン, 東京) を使用して観察した。

また、酵素抗体法による osteocalcin 免疫染色を行った。切片は、1:50 に希釈した一次抗体 (抗 osteocalcin 抗体; R&D) とともに 4°C 、12 時間反応させ、続いて Histofine Simplestain ラットシステム (株式会社ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用いて染色後、光学顕微鏡 (株式会社ニコン) を使用して観察した。

8. 統計処理

ラット頭頂骨欠損部の不透過像の体積に関するデータの処理には、一元配置分散分析を用い、

Bonferroni による多重比較検定を行った。有意水準は 5%とした。統計分析は、SPSS ソフトウェア、バージョン 15.0 (SPSS Japan, 東京) を使用した。

III. 結 果

1. DPSCs の同定

1) 表面抗原解析

DPSCs における表面抗原の発現は、幹細胞マーカーである CD29 ($89.0 \pm 2.18\%$)、CD49d ($60.3 \pm 5.81\%$) および CD90 ($82.9 \pm 1.82\%$) に対して陽性であった。一方、造血幹細胞マーカーである CD34 ($1.72 \pm 0.49\%$) および CD45 ($0.06 \pm 0.04\%$) に対して陰性を示した。

2) 多分化能評価

DPSCs は脂肪細胞への分化誘導を行った結果、oil red O 染色および FABP-4 免疫染色において脂質および FABP-4 が検出され、脂肪分化が認められた。また、骨芽細胞への分化誘導を行った結果、ALP 染色および osteocalcin 免疫染色において ALP および osteocalcin を検出し、骨分化が認められた。

2. DPSC-EVs の同定

1) 透過型電子顕微鏡による形態観察

TEM を用いた観察により、DPSC-EVs が直径約 100nm の円形の形態を示すことを認めた。

2) DPSC-EVs に含有されるタンパク質の検出

Western blot 法を用いて、DPSC-EVs に含まれるタンパク質を検出した結果、CD9 および α -tubulin の発現が認められた。

3. マイクロ CT による形態計測および定量分析

術後 4 週に硬組織形成の観察を行った。移植側において、DPSC-EVs/collagen および DPSCs/collagen は骨欠損部辺縁および骨欠損内部に不透過像を認めた。DPSC-EVs/ β -TCP、DPSC-EVs/HA、DPSCs/ β -TCP および DPSCs/HA は、骨欠損内部に顆粒状の不透過像、骨欠損部辺縁に不透過像を認めた。

一方、対照側については、生理食塩水および collagen 単体移植において骨欠損部辺縁に不透過像を認めた。 β -TCP 単体移植および HA 単体移植は骨欠損内部に顆粒状の不透過像、骨欠損部辺縁に不透過像を認めた。

マイクロ CT における不透過像の定量分析より、DPSCs/collagen および DPSC-EVs/collagen において新たに形成された不透過像体積は、生理食塩水と比較し、有意に増加した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。DPSC-EVs/collagen は DPSCs/collagen との比較において、有意差を認めなかった。DPSC-EVs/collagen と collagen 単体との間には有意差は認められないものの、不透過像体積の増加が確認された。

4. ラット頭頂骨欠損部の組織観察

1) HE 染色

術後 16 週に組織観察を行った。移植側においては、DPSC-EVs/collagen は、collagen の吸収を認め、骨欠損部辺縁および骨欠損内部に新生骨の形成を認めた (図 10a, h)。DPSC-EVs/ β -TCP は、 β -TCP 顆粒の吸収および骨欠損部辺縁に新生骨を認めた。DPSC-EVs/HA は、骨欠損内部に HA 顆粒および骨欠損部辺縁に新生骨を認めた。

対照側については、collagen 単体移植においては、collagen の吸収を認め、骨辺縁部とその周囲に新生骨の形成を認めた。 β -TCP 単体移植においては、 β -TCP 顆粒の吸収および骨欠損部辺縁部に新生骨を認めた。HA 単体移植においては、骨欠損内部に HA 顆粒および骨欠損部辺縁部に新生骨を認めた。生理食塩水は、線維性結合組織の形成を認めた。炎症反応はどのグループにおいても観察されなかった。

2) Osteocalcin 免疫染色

術後 16 週に osteocalcin 免疫染色を行った。osteocalcin が褐色に染色され、検出された。DPSC-EVs/collagen において、骨欠損部辺縁および骨欠損内部に新生骨の形成を認めた。collagen 単体移植では、骨欠損部辺縁とその周囲において、新生骨の形成を認めた。 β -TCP 単体移植および HA 単体移植においては、骨欠損部辺縁に新生骨の形成を認めた。一方、生理食塩水では、骨欠損内部において新生骨の形成は認められなかった。

IV. 考 察

1. 本研究の意義

顎顔面領域の腫瘍や外傷等による歯や顎骨の欠損、抜歯後における顎堤吸収が生じる場合には、顔面の審美障害、構音・咀嚼機能障害が生じることから生活の質が低下する²⁷⁾。そのため、有床義歯による補綴歯科治療を施行することは、これらの障害を回復・改善する上で有効な方法であるが、疾患により形態的・機能的回復が困難な場合が認められる。顎顔面領域は、四肢骨に比較して過重負荷がかかりにくく、骨組織再生に適した領域であるとされることから、近年、補綴歯科領域への骨組織再生の有効性に関する研究が報告されている^{7, 28)}。

損傷した組織に対する細胞療法は、様々な細胞を用いて行われ、その効果が報告⁴⁾されている。なかでも MSCs は、ある特定の細胞に分化誘導させることで再生医療の細胞源となる可能性に加え、未分化な MSCs の免疫調節作用が知られている²⁹⁾。国内においては、急性移植片対宿主病および外傷性脊髄損傷に対して MSCs を用いた治療が行われている⁶⁾。一方、歯科領域においては、顎骨、歯周組織、歯髄といった組織の損傷に対して、骨髄、脂肪、歯髄等を由来とした MSCs を用いた臨床研究が試みられている¹⁶⁾。

このように、各種の疾患に対する治療法として MSCs が用いられているが、MSCs の持つ治療効果の一因には、MSCs の放出する MSC-EVs 等の効果によることが、近年、明らかとなっている^{11, 30)}。

MSC-EVs の研究は、MSCs が有する作用機序、組織再生をより解明するためにも重要と考えられる。最近、Ishiy³¹⁾らは、慢性腎動脈狭窄を誘発したラットモデルの研究について、脂肪組織由来 MSC-EVs の治療効果を脂肪組織由来 MSCs と比較し、脂肪組織由来 MSC-EVs は脂肪組織由来 MSCs と同様の有益な改善をもたらしたが、脂肪組織由来 MSCs よりも腎機能の一部を改善する効

果は低かったことを報告している。このことは、EVs を治療へ応用する際には、損傷を受けた組織の機能に応じて EVs を用いる必要があることを示唆している。このように、MSC-EVs は、MSCs の治療効果の一部を MSC-EVs が担うことで治療の有効性を示すとの報告³²⁾はあるが、DPSC-EVs の有効性については不明な点が多い。

そこで本研究では、DPSC-EVs が DPSCs の骨組織再生促進効果の一因であるとの仮説を立て、DPSC-EVs/足場材料 (collagen、 β -TCP、HA) と DPSCs/足場材料 (collagen、 β -TCP、HA) をそれぞれ用いてラット頭頂骨欠損モデルを構築し、DPSC-EVs の骨組織再生への有効性について検証を行った。その結果、DPSC-EVs では骨欠損部に新生骨の形成が認められたことから、DPSCs の骨組織形成作用の一因には DPSC-EVs が関与していることが明らかとなった。本研究は、DPSCs の骨組織再生促進の作用機序を解明する一助となり、さらに DPSC-EVs を用いた骨組織再生治療への可能性を示す重要な知見を有している。

2. 本研究の結果

1) DPSC-EVs と collagen の併用による解析

本研究では、DPSC-EVs に collagen、 β -TCP、HA を組み合わせた全ての移植において、ラット頭頂骨欠損部に新生骨の形成を確認した。MSC-EVs は足場材料と併用することにより広範な血管新生を促進し、優れた骨組織を形成する³³⁻³⁸⁾。これまでにヒト骨髄由来 MSCs からの exosomes と collagen³³⁾、ヒト iPS 細胞由来 MSCs からの exosomes と β -TCP^{34,35)}、ヒト骨髄由来 MSCs からの exosomes と HA³⁶⁾ についての報告があり、対照側に足場材料を単独で移植した場合と比較して、EVs を組み合わせて使用することによって優れた骨組織再生効果を発揮するとされている。本研究では、マイクロ CT による三次元構築画像および HE 染色組織像より、DPSC-EVs/collagen 移植においては骨欠損部の辺縁および内部において新生骨が確認された。DPSC-EVs/ β -TCP 移植および DPSC-EVs/HA 移植においては、骨欠損部の辺縁に新生骨が確認された。MSCs 由来の exosomes は、I 型 collagen やフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質に直接結合すると報告されている³⁹⁾。また、ヒト胎盤由来 MSCs-EVs と collagen を組み合わせた研究においては、collagen が EVs の保持と安定性を高めて持続的に EVs の作用を促進し、マウス急性腎障害に対する EVs 治療の有効性が報告されている⁴⁰⁾。

一方、collagen の使用は、細胞の増殖、生存率の上昇をもたらしたとする報告もある⁴¹⁾。したがって、本研究においても、DPSC-EVs と collagen を併用することで、DPSC-EVs の効果を持続させ、骨欠損部周囲の幹細胞の生着を促し、 β -TCP および HA には認められなかった骨欠損内部からの骨組織再生を促進したと考えられる。

EVs の内包物であるタンパク質、脂質、RNA、DNA 等は、レシピエント細胞内に放出されることで作用する。EVs は様々な成分を含有しているが、重要な因子として特に microRNA (miRNA) が注目されている。miRNA は生体内において複数の遺伝子を標的にその発現レベルを調節する役割を担っている。疾患特異的な miRNA を標的にすることで、1つの遺伝子やタンパク質を治療標的とするよりも、関連するネットワーク上の複数の遺伝子発現調節を同時に改善する効果が期待できる⁴²⁾。miRNA は 20 塩基程度からなる内在性の微小機能性核酸であり、相補的な配列を持つ mRNA に作用することで、標的遺伝子の発現を負に調節する。現在、ヒトでは 2,500 種類以上の miRNA が報告されており、様々な生命現象や多くの疾患への関与が報告されている⁴³⁾。

Zheng⁴⁴⁾らは、DPSC-EVs の miRNA はマクロファージの極性化に影響を及ぼし、マクロファージをより抗炎症性の表現型に切り替えることを明らかにしている。DPSC-EVs に含まれる miR-125a-3p は、マクロファージの Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) および下流にある nuclear factor kappa B (NF κ B) シグナル伝達経路を阻害することで、より多くのマクロファージが M2 マーカー (抗炎症作用の際に出現) である CD206 を発現させ、抗炎症性サイトカイン IL-10 および IL-1ra を増加させるとされている。

本研究は、ラット頭頂骨欠損部へ DPSC-EVs/足場材料 (collagen、 β -TCP、HA) を移植し、術後 16 週において組織学的評価を行ったものであり、DPSC-EVs と collagen との組み合わせにより新生骨形成が明らかとなったことから、骨形成過程における抗炎症に作用するマクロファージの関与が考えられる。今後、DPSC-EVs の詳細な作用機序については、組織学的分析と *in vitro* 実験系による細胞内シグナル伝達系の分析により明らかとなるものと考えている。

2) DPSC-EVs の臨床応用

近年、MSC-EVs を応用した治療法の開発が行われている⁴⁵⁾。MSC-EVs を評価する臨床試験として、Nassar ら⁴⁶⁾は、40 人の慢性腎臓病患者を治療群とプラセボ群に分け、治療群にヒト臍帯血由来 MSCs-EVs を 1 週間の間隔を空けて 2 回投与した。その結果、ヒト臍帯血由来 MSCs-EVs の投与が安全であり、慢性腎臓病患者の腎機能が改善することを報告している。また、Kordelas ら⁴⁷⁾の報告では、難治性の移植片対宿主病患者の治療に対して骨髄由来 MSCs からの exosomes を用いたところ、皮膚や粘膜の症状等が改善し、病状の安定が得られたと報告している。さらに非臨床試験であるが、中崎ら⁴⁸⁾は、脊髄損傷ラットに対して自発運動の改善を達成するために、MSC-EVs を投与する治療方法を考案しており、損傷部の改善を図るためには MSC-EVs の複数回の投与が有効であると報告している。

このように Nassar ら⁴⁶⁾、Kordelas ら⁴⁷⁾の臨床試験、中崎ら⁴⁸⁾の *in vivo* 試験で示されたデータは、MSC-EVs の安全性と有効性を示唆するものである。しかし、DPSC-EVs に関する臨床試験の報告はないことから、本研究にて検討している DPSC-EVs を使用した最適な臨床効果、即ち、骨組織再生の効果をさらに促進させる治療戦略としては、DPSC-EVs を足場材料との併用により骨欠損部へ投与した後、一定の間隔にて複数回の DPSC-EVs 投与が有効であるとされており、今後 *in vitro* 実験系を工夫して取り組んでいく予定である。

V. 結 論

本研究の結果より、術後 4 週のマイクロ CT および定量解析の結果から、DPSC-EVs/collagen は骨欠損部位において DPSCs/collagen と同等の効果が認められた。また、術後 16 週の組織観察より、DPSC-EVs/collagen は足場材料である collagen 単体移植と比較して新生骨の形成が認められた。

これらの結果より、DPSCs の骨組織形成作用の一因には DPSC-EVs が関与していることを示すものであり、DPSC-EVs を応用した骨組織再生治療への有効性が示唆された。

参考文献

- 1) 国立研究開発法人 科学技術振興機構 研究開発戦略センター：研究開発の俯瞰報告書。ライフサイエンス・臨床医学分野，204-219，2021.
- 2) 三田村好矩：再生医療と人工臓器。人工臓器，**31** (3)：63-64，2002.
- 3) Tollemar V, Collier ZJ, Mohammed MK, Lee MJ, Ameer GA, Reid RR：Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. Genes Dis, **3** (1)：56-71，2016.
- 4) 梅澤明弘，宮本義孝：再生医療・細胞医療と幹細胞。日耳鼻会報，**114** (7)：593-601，2011.
- 5) 中畑龍俊：再生医療の現状と問題点。炎症・再生，**24** (2)：84-91，2004.
- 6) 村田誠：骨髄由来間葉系幹細胞。日内会誌，**108**：1369-1374，2019.
- 7) 秋山謙太郎，古味桂子，窪木拓男：間葉系幹細胞の新しい機能—免疫調節細胞としての間葉系幹細胞—。日補綴会誌，**8**：346-353，2016.
- 8) 竹谷健：先天性骨系統疾患に対する再生医療：低ホスファターゼ症に対する間葉系幹細胞移植。日小児放線会誌，**37** (1)：34-41，2021.
- 9) Hata M, Omi M, Kobayashi Y, Nakamura N, Tosaki T, Miyabe M, Kojima N, Kubo K, Ozawa S, Maeda H, Tanaka Y, Matsubara T, Naruse K：Transplantation of cultured dental pulp stem cells into the skeletal muscles ameliorated diabetic polyneuropathy：therapeutic plausibility of freshly isolated and cryopreserved dental pulp stem cells. Stem Cell Res Ther, **6** (1)：162，2015.
- 10) 永谷憲歳：間葉系幹細胞を用いた心血管再生療法。心電図，**28** (4)：328-332，2008.
- 11) Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Lim SK：Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res, **4** (3)：214-22，2010.
- 12) 勝田毅，落谷孝広：新規治療薬開発への間葉系幹細胞由来エクソソームの応用可能性。Drug Deliv Syst, **29** (2)：140-151，2014.
- 13) Grange C, Tapparo M, Bruno S, Chatterjee D, Quesenberry PJ, Tetta C, Camussi G：Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. Int J Mol Med, **33** (5)：1055-1063，2014.
- 14) 吉岡祐亮，落谷孝広：エクソソームによる新規 DDS キャリアの開発。Drug Delivery Syst, **35** (1)：35-46，2020.
- 15) Pomatto M, Gai C, Negro F, Cedrino M, Grange C, Ceccotti E, Togliatto G, Collino F, Tapparo M, Figliolini F, Lopatina T, Brizzi MF, Camussi G：Differential Therapeutic Effect of Extracellular Vesicles Derived by Bone Marrow and Adipose Mesenchymal Stem Cells on Wound Healing of Diabetic Ulcers and Correlation to Their Cargoes. Int J Mol Sci, **22** (8)：3851，2021.
- 16) 末廣史雄，西村正宏：補綴領域で目指す再生医療。日補綴会誌，**10** (2)：105-110，2018.
- 17) 新部邦透，江草宏：補綴歯科領域で期待される幹細胞。日補綴会誌，**10** (3)：230-237，2018.

- 18) 国立保健医療科学院: ヒト幹指針への適合性が承認され我が国で実施されているヒト幹細胞臨床研究の一覧.
https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/iryousaisei06/pdf/111201_4.pdf
(2021年11月4日アクセス)
- 19) Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S : Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A, **97** (25) : 13625-13630, 2000.
- 20) 浅川剛吉, 坂田一恵, 嘉手納未季, 船津敬弘 : ヒト (歯根膜・歯髄) 由来細胞の分離培養方法. *Dental Med Res*, **34** (1) : 41-44, 2014.
- 21) Kong F, Wu CT, Geng P, Liu C, Xiao F, Wang LS, Wang H : Dental Pulp Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Mitigate Haematopoietic Damage after Radiation.
Stem Cell Rev Rep, **17** (2) : 318-331. 2021.
- 22) Swanson WB, Zhang Z, Xiu K, Gong T, Eberle M, Wang Z, Ma PX : Scaffolds with controlled release of promineralization exosomes to promote craniofacial bone healing without cell transplantation. *Acta Biomater*. **118** : 215-232, 2020.
- 23) 風間智彦 : 間葉系幹細胞の基礎と臨床. *日大医学雑誌*, **75** (2) : 61-66, 2016.
- 24) Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, Matsuyama S, Nakasa T, Kamei N, Akimoto T, Higashi Y, Ochi M : Mesenchymal stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett*, **589** (11) : 1257-65, 2015.
- 25) Miyata Y, Ozawa S, Kojima N, Kondo Y, Matsukawa R, Tanaka Y : An experimental study of bone grafting using rat milled tooth.
Int J Oral Maxillofac Implants, **26** (6) : 1210-6, 2011.
- 26) Matsukawa R, Ozawa S, Kondo Y, Miyata Y, Mizutani M, Ohno N, Tanaka Y : Immunohistological observation of milled teeth in a rat mandibular incisor extraction socket. *J Hard Tissue Biol*, **23** (1) : 29-34, 2014.
- 27) 谷口尚, 隅田由香, 初野有人 : 頭頸部癌術後の咀嚼・嚥下のリハビリテーション—顎補綴の立場から—. *頭頸部癌*, **31** (3) : 319-325, 2005.
- 28) 高戸毅, 星和人, 藤原夕子, 西條英人, 菅野勇樹, 大久保和美, 鄭雄一, 森良之 : 顎顔面領域における骨軟骨再生医療の現状と展望. *頭頸部外科*, **22** (2) : 121-124, 2012.
- 29) Le Blanc K, Mougiakakos D : Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*, **12** (5) : 383-96, 2012.
- 30) 川本弘一, 今野雅允, 石井秀始, 富丸慶人, 濱直樹, 和田浩志, 小林省吾, 江口英利, 種村匡弘, 伊藤壽記, 土岐祐一郎, 森正樹, 永野浩昭 : 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた細胞療法の膝島移植への応用 CD90high 脂肪由来間葉系幹細胞亜分画の有効性.
Organ Biol, **21** (2) : 215-220, 2014.
- 31) Ishiy CSRA, Ormanji MS, Maquigussa E, Ribeiro RS, da Silva Novaes A, Boim MA : Comparison of the Effects of Mesenchymal Stem Cells with Their Extracellular Vesicles on the Treatment of Kidney Damage Induced by Chronic Renal Artery Stenosis. *Stem Cells Int*, **2020** : 8814574, 2020.

- 32) Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH : Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles : novel frontiers in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther, **9** (1) : 63, 2018.
- 33) Takeuchi R, Katagiri W, Endo S, Kobayashi T : Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis. PLoS One, **14** (11) : e0225472, 2019.
- 34) Qi X, Zhang J, Yuan H, Xu Z, Li Q, Niu X, Hu B, Wang Y, Li X : Exosomes Secreted by Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Repair Critical-Sized Bone Defects through Enhanced Angiogenesis and Osteogenesis in Osteoporotic Rats. Int J Biol Sci, **12** (7) : 836-49, 2016.
- 35) Zhang J, Liu X, Li H, Chen C, Hu B, Niu X, Li Q, Zhao B, Xie Z, Wang Y : Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway. Stem Cell Res Ther, **7** (1) : 136, 2016.
- 36) Liang B, Liang JM, Ding JN, Xu J, Xu JG, Chai YM : Dimethylalloylglycine-stimulated human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes enhance bone regeneration through angiogenesis by targeting the AKT/mTOR pathway. Stem Cell Res Ther, **10** (1) : 335, 2019.
- 37) Chen S, Tang Y, Liu Y, Zhang P, Lv L, Zhang X, Jia L, Zhou Y : Exosomes derived from miR-375-overexpressing human adipose mesenchymal stem cells promote bone regeneration. Cell Prolif, **52** (5) : e12669, 2019.
- 38) Zhang Y, Hao Z, Wang P, Xia Y, Wu J, Xia D, Fang S, Xu S : Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture. Cell Prolif, **52** (2) : e12570, 2019.
- 39) Narayanan R, Huang CC, Ravindran S : Hijacking the Cellular Mail : Exosome Mediated Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Int, **2016** : 3808674, 2016.
- 40) Liu Y, Cui J, Wang H, Hezam K, Zhao X, Huang H, Chen S, Han Z, Han ZC, Guo Z, Li Z : Enhanced therapeutic effects of MSC-derived extracellular vesicles with an injectable collagen matrix for experimental acute kidney injury treatment. Stem Cell Res Ther, **11** (1) : 161, 2020.
- 41) Somaiah C, Kumar A, Mawrie D, Sharma A, Patil SD, Bhattacharyya J, Swaminathan R, Jaganathan BG : Collagen Promotes Higher Adhesion, Survival and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. PLoS One, **10** (12) : e0145068, 2015.
- 42) 新飯田俊平 : 新たな核酸創薬への期待 —マイクロ RNA 研究の最近の動向—. 科学技術動向, **124** : 24-33, 2011.
- 43) 谷口高平 : microRNA 創薬による次世代がん治療. 大阪医大誌, **77** (1/2) : 57-69, 2018.
- 44) Zheng J, Kong Y, Hu X, Li Z, Li Y, Zhong Y, Wei X, Ling J : MicroRNA-enriched small extracellular vesicles possess odonto-immunomodulatory properties for modulating the immune response of macrophages and promoting odontogenesis.

- Stem Cell Res Ther, **11** : 517, 2020.
- 45) 西田奈央 : エクソソームを応用した治療法の開発. 落谷孝広, 吉岡祐亮, 医療を変えるエクソソーム- 生体機能から疾患メカニズム、臨床応用まで
1 版. 化学同人 (京都), 201-210, 2018.
- 46) Nassar W, El-Ansary M, Sabry D, Mostafa MA, Fayad T, Kotb E, Temraz M, Saad AN, Essa W, Adel H : Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases.
Biomater Res, **20** : 21, 2016.
- 47) Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doepner TR, Epple M, Horn PA, Beelen DW, Giebel B : MSC-derived exosomes : a novel tool to treat therapyrefractory graft-versus-host disease. Leukemia, **28** ; 970-973, 2014.
- 48) Nakazaki M, Morita T, Lankford KL, Askenase PW, Kocsis JD : Small extracellular vesicles released by infused mesenchymal stromal cells target M2 macrophages and promote TGF- β upregulation, microvascular stabilization and functional recovery in a rodent model of severe spinal cord injury.
J Extracell Vesicles, **10** (11) : e12137, 2021.